

Clostridium difficile の孢子形成に必須のビタミン, ミネラル

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 中村信一教授)

川 辺 清 光

偽膜性大腸炎, 一部の抗生物質関連下痢症の原因菌である *Clostridium difficile* (*C. difficile*) の孢子形成に必須のビタミン, ミネラルについて5菌株を用いて検討した。各ビタミン欠損合成培地を使用することにより十分な孢子形成・発育には, Ca-D-パントテン酸, ビオチン, ピリドキシンが5株全株において必須である事が分かった。また, ビオチン, ピリドキシンは特に孢子形成に必要であることが示唆された。VPI 10463 株を用い Ca-D-パントテン酸, ビオチン, ピリドキシン濃度と孢子形成の関係を検討した結果, Ca-D-パントテン酸, ビオチン, ピリドキシンは各々1,000, 0.5, 10 μ g/l の時, 孢子形成・発育は最高値に達した。各ミネラル欠損合成培地を用い, 十分な孢子形成には Mg²⁺, Fe²⁺, K⁺, PO₄³⁻ が5株全株において必須である事が分かった。また, Mg²⁺, Fe²⁺, K⁺ は特に孢子形成に必須である事が示唆された。VPI 10463 株を用い Mg²⁺, Fe²⁺, K⁺, PO₄³⁻ の必要濃度について検討した結果, 各々0.1, 0.001, 0.5, 5mM の時, 孢子形成・発育は最高値に達した。NaHCO₃ 欠損培地における菌の発育は良好であったが, 培養菌液の pH は著しく低く (5.8~6.2), 孢子形成も悪かった。即ち, NaHCO₃ は培地 pH の低下を防ぐために必要であり, NaHCO₃ 濃度が 40mM 以上の時, 培養菌液の pH は6.8以上を示し十分な孢子形成が得られた。被験5菌株は共に NaCl 濃度が 400mM の時, 孢子形成・菌の発育は共に認められなかった。以上の結果は, 腸内細菌叢として存在する *C. difficile* は, その孢子形成・発育に, 同じ腸内細菌叢として存在する *Clostridium perfringens* とほぼ同種類のビタミン, ミネラルを必要とすることを示している。また, 本菌の食塩耐性は *Clostridium* 菌種の中では比較的弱いことを示している。

Key words *C. difficile*, sporulation, vitamin, mineral, synthetic medium

Clostridium difficile (*C. difficile*) は偽膜性大腸炎, 一部の抗生物質関連腸炎の原因菌である¹⁾。本菌の主病原因子は2種類の毒素, トキシンA (エンテロトキシン) およびトキシンB (サイトトキシン) であると考えられている²⁾。

ヒトの *C. difficile* 腸炎においては腸内フローラとして存在している *C. difficile* による内因感染が主な感染経路であると考えられているが, 病院での集団発生では外因感染が考えられている^{3)~5)}。外因感染の場合, *C. difficile* 腸炎患者糞便からの *C. difficile* による病院環境の汚染が原因となる。この場合, 本菌は嫌気性孢子形成菌であるので栄養型は大気下では速やかに死滅する。しかしながら, 菌の耐久型である孢子は大気下でも長期間生存し, 外因感染を引き起こす³⁴⁾。

ヒトの *C. difficile* 腸炎の治療にはバンコマイシンが使われるが, バンコマイシン投与を中止するとしばしば本腸炎が再発する⁶⁾。再発の原因はバンコマイシン投与により *C. difficile* の栄養型細胞は死滅するが, 孢子が死滅せず生存し, 薬剤の投与中止により発芽・増殖することによると考えられている⁷⁾。

以上のことは *C. difficile* の孢子形成が *C. difficile* 腸炎に重要な役割を演じていることを示すものであり, その形成条件を明らかにすることは, *C. difficile* 腸炎の予防・発症機序解明に連なるものである。沖野⁸⁾ は本菌の孢子形成・発育に必須のアミノ酸, 孢子形成を促進するアミノ酸を明らかにした。

本研究では, *C. difficile* の孢子形成に必須のビタミン, ミネラルについて検討した。また, NaCl の発育抑制作用についても併せて検討した。

材料と方法

I. 使用菌株

金沢大学医学部微生物学講座保存の *C. difficile* 有毒株5菌株を用いた。即ち, バージニアポリテクニク研究所および州立大学, 嫌気性菌研究所 (Virginia Polytechnic Institute and State University, Anaerobe Laboratory) 菌株の VPI 10463 株, 著者の研究室で健康成人から分離した KZ 1630 株, 抗生物質関連下痢症患者から分離した KZ 1626, KZ 1647, KZ 1748 株を使用した。

II. 培地

Haslam ら⁹⁾ のアミノ酸, ビタミン, 蓮池ら¹⁰⁾ のミネラル, 0.2% グルコースを含む培地を基礎合成培地 (basal synthetic medium, BSM) とした (表1)。ただし, 沖野⁸⁾ の成績に基づきプロリン濃度は 0.6g/l とした。

BSM は以下の如くに作製した。1.25倍濃度のアミノ酸・ビタミン・グルコース溶液の pH を NaOH 溶液を用いて7.4に調整した後, 10倍濃度のミネラル溶液, 5% NaHCO₃ 溶液を培地の最終容量の 1/10量加えた (培地の最終 pH は約7.6)。培地は

平成5年12月3日受付, 平成5年12月24日受理

Abbreviations: BHI, brain heart infusion; BSM, basal synthetic medium; *C. botulinum*, *Clostridium botulinum*; *C. difficile*, *Clostridium difficile*; *C. perfringens*, *Clostridium perfringens*; GS-BHI, glucose and soluble starch-fortified BHI; m-BHI, modified BHI; OD, optical density at 560 nm; OD_{max}, maximal OD

HA フィルター (日本ミリポアリミテッド, 東京) にて濾過滅菌後, 中試験管 (15×160mm) に 10ml ずつ分注した。気相を H_2 10%, CO_2 10%, N_2 80% の混合ガスに置換した後 4℃ にて保存した。培地を還元するため置換48時間後に使用した。孢子形成に良好な複合培地としてブレイン ハート インフュージョン (brain heart infusion, BHI) (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA) に Na_2HPO_4 を 0.2% の割合に添加した培地 (modified BHI, m-BHI)¹¹⁾ を用いた。120℃ 15分高圧蒸気滅菌後, 合成培地の場合と同様, 気相を混合ガスに置換し 4℃ にて保存した。

総菌数, 孢子数の測定には 0.8% グルコース, 1.0% 可溶性デンプン (和光, 大阪), 0.05% システイン-塩酸塩, 1.3% 寒天加 BHI (日水, 東京) (glucose and soluble starch-fortified BHI, GS-BHI) 培地¹²⁾ を用いた。

III. 植菌および培養

BSM 16時間培養液の 10^{-3} 希釈液 0.1ml を 10ml の被験培地に植菌した (栄養型細胞数, 10^7 /ml, 孢子数, < 1 /ml)。希釈, 植菌は全て上述の混合ガス噴射下で行い, 同ガス存在下で 37℃ で培養した。5 日間培養後, 孢子数を測定した。

IV. 菌の増殖の測定

菌の増殖の測定は島津ボッシュロム スペクトロニック 20A (島津, 京都) を用い, 波長 560nm の吸光度 (optical density at 560nm, OD) を測定することにより行った。

V. 孢子数の測定

孢子数の測定は, 0.1% タウロコロール酸ナトリウム (GR, ナカライテスク, 京都) 添加 GS-BHI 培地を用い混釈培養法により行った (タウロコロール酸ソーダ法)¹³⁾。培養菌液を 70℃ 10分加熱後, 0.05% システイン-塩酸塩加 BHI (日水) で 10 倍段階希釈を行い, その 0.1ml を直径 90mm のペトリ皿に注入し, 56℃ に

保温した 0.1% タウロコロール酸ナトリウム添加 GS-BHI 培地 20ml を加え混和した。固化後 37℃ にて 2 日間嫌気ジャーを用い嫌気培養を行った。培養後成育したコロニー数を数えることにより培養液 1ml 当たりの孢子数を算出した。

成 績

1. ビタミン

1. 孢子形成に必須のビタミン

ビタミン 1 種類のみを欠損した BSM における孢子形成・菌の発育を各菌株について検討し, *C. difficile* の孢子形成に必須のビタミンを求めた。各ビタミン欠損培地において形成される孢子数が BSM における孢子数に比べ, 10^{-1} 倍以下の時, そのビタミンを孢子形成に必須のビタミンと判定した。また菌の発育を培養期間中の最高 OD 値 (maximal OD, OD_{max}) で比較した (表 2)。

使用菌株は m-BHI では $10^{6.3-7.2}$ /ml, BSM では $10^{5.2-6.4}$ /ml の孢子を形成した。

Ca-D-パントテン酸欠損 BSM においては, 菌の発育はいずれの菌株についても肉眼的には認めることが出来なかった。孢子数も VPI 10463 株では全く認められず, 他の 4 株においても $10^{0.8-10^{2.5}}$ /ml 検出されずにすぎなかった。

ビオチン欠損 BSM における OD_{max} は 0.12~0.16 であり, BSM (OD_{max} , 0.71~0.75) の約 1/5 程度に認められたが, 孢子形成は極めて悪く, 2 株 (KZ 1647, KZ 1748) を除き, BSM の 10^{-1} 以下にすぎなかった。

ピリドキシン欠損培地における OD_{max} は 0.21~0.27 を示し, 発育の良好な菌株では BSM の 1/3 程度であり, かなり良好であった。しかしながら, 孢子形成は BSM に比べ不良であり $10^{-0.8}$ (KZ 1647 株)~ $10^{-3.8}$ (VPI 10463 株) にすぎなかった。

Table 1. Composition of basal synthetic medium (BSM)

Amino acids (g)		Vitamins (μ g)	
Histidine	0.1	Thiamine	1,000
Tryptophan	0.1	Ca-D-pantothenate	1,000
Glycine	0.1	Nicotinamide	1,000
Tyrosine	0.1	Riboflavin	1,000
Arginine	0.2	Pyridoxin	1,000
Phenylalanine	0.2	p-aminobenzoic acid	50
Methionine	0.2	Biotin	12.5
Threonine	0.2	Folic acid	12.5
Alanine	0.2	B ₁₂	5.0
Lysine	0.3	Minerals (mg)	
Serine	0.3	KH ₂ PO ₄	900
Valine	0.3	Na ₂ HPO ₄	5,000
Aspartic acid	0.3	NaCl	900
Isoleucine	0.3	CaCl ₂ · 2H ₂ O	26
Leucine	0.4	MgCl ₂ · 6H ₂ O	20
Cysteine	0.5	MnCl ₂ · 4H ₂ O	10
Proline	0.6	(NH ₄) ₂ SO ₄	40
Glutamic acid	0.9	FeSO ₄ · 7H ₂ O	4
Glucose (g)	2.0	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1
		NaHCO ₃	5,000
		Distilled water (ml)	1,000

All amino acids except for cysteine (Kanto Chemical, Tokyo) and all vitamins except for biotin (Sigma, St. Louis, USA) were purchased from Wako, Osaka.

他の6種のビタミンについては孢子形成・菌の発育共にBSMと同程度であった。なお、いずれの培養においても培養5日目のpHはほぼ等しく7.1~7.3であった。

以上の結果、孢子形成に必須のビタミンはCa-D-パントテン酸、ビオチン、ピリドキシンであり、これらは同時に菌の発育に必須のビタミンであることが分った。

2. 孢子形成に必須のビタミンの濃度

VPI 10463株を用い、孢子形成に必須のCa-D-パントテン酸、ビオチン、ピリドキシンの必要濃度について検討した。

前培養にはCa-D-パントテン酸およびビオチンの場合にはBSM、ピリドキシンの場合にはピリドキシン濃度が10 μ g/lのBSMを用いた。

いずれのビタミンの場合にも孢子形成および菌の発育は濃度依存性に増加したが、孢子数の増加に必要な濃度の1/10の低濃度のビタミン濃度において、既に菌の発育の増加が認められた。また十分な孢子形成に要する量と十分な菌の発育に必要な量とは等しかった。

Ca-D-パントテン酸の場合、孢子形成・菌の発育は各々、50 μ g/l, 1 μ g/l以上の時上昇し、1,000 μ g/lの時最高値に達した(図1)。

ビオチンの場合、孢子形成・菌の発育は各々、0.1 μ g/l, 0.01 μ g/l以上の時上昇し、0.5 μ g/lの時最高値に達した。

ピリドキシンの場合、孢子形成・菌の発育は各々、0.5 μ g/l, 0.05 μ g/l以上の時上昇し、10 μ g/lの時最高値に達した。

II. ミネラル

本合成培地の緩衝系はリン酸緩衝系と炭酸緩衝系であり、関

与するミネラルはNa₂HPO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃である。培地のpHの変動は孢子形成に大きく影響するので非緩衝系ミネラルと緩衝系に分けて検討した。いずれの場合にも、ミネラル1種類のみを欠損したBSMにおける孢子形成・菌の発育を検討し、孢子形成に必須のミネラルを求めた。ビタミンの場合と同様、各ミネラル欠損培地における孢子数がBSMにおける孢子数に比べ、10⁻¹倍以下の時、そのミネラルを孢子形成に必須のミネラルと判定した。

1. 非緩衝系ミネラル

1) 孢子形成に必須のミネラル

MgCl₂欠損BSMにおけるOD_{max}は0.17~0.21であり、菌の発育はBSM(OD_{max}, 0.68~0.80)の1/3~1/4程度に認めら

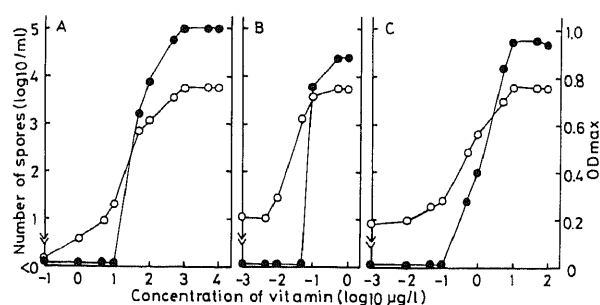


Fig. 1. Relationship between concentration of Ca-D-pantothenate (A), biotin (B), or pyridoxine (C) and sporulation in *C. difficile* VPI 10463 strain. ○, OD_{max} (the maximum value of OD₅₆₀ during 5 days of incubation); ●, number of spores produced.

Table 2. Effect of vitamin deletion on growth and sporulation of *C. difficile* strains

Deleted vitamin ^{a)}	Growth ^{b)} and number of spores (log ₁₀ /ml) in strains									
	VPI 10463		KZ 1626		KZ 1647		KZ 1630		KZ 1748	
	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore
Ca-D-pantothenate	—	— ^{c)}	—	0.8	—	1.9	—	0.3	—	2.5
Biotin	+	0.7	+	1.5	+	3.5	+	1.3	+	3.5
Pyridoxine	+	1.8	+	3.3	+	4.3	+	2.5	+	4.4
Other 6 vitamins ^{d)}	+	5.3~5.8	+	5.6~6.0	+	5.0~5.6	+	5.4~6.1	+	6.1~6.7
None	+	5.6	+	5.7	+	5.2	+	5.8	+	6.4

a) Growth and sporulation in each vitamin-deleted BSM were examined.

b) —, no visible growth; +, the maximum value of OD₅₆₀ during 5 days of incubation (OD_{max}) ≤ 0.2; ++, 0.2 < OD_{max} ≤ 0.4; +++, OD_{max} > 0.4.

c) —, no spore/ml.

d) Thiamine, nicotinamide, riboflavin, p-aminobenzoic acid, folic acid and B₁₂.

Table 3. Effect of mineral deletion on growth sporulation of *C. difficile* strains

Deleted mineral ^{a)}	Growth ^{b)} and number of spores (log ₁₀ /ml) in strains									
	VPI 10463		KZ 1626		KZ 1647		KZ 1630		KZ 1748	
	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore
MgCl ₂	+	— ^{c)}	+	0.5	+	4.5	+	1.6	+	2.6
FeSO ₄	+	3.7	+	4.5	+	3.8	+	3.4	+	5.4
Other 5 minerals ^{d)}	+	5.3~6.1	+	5.8~6.2	+	5.6~6.2	+	5.4~5.9	+	6.2~6.7
None	+	5.4	+	5.6	+	5.9	+	5.6	+	6.6

a) Growth and sporulation in each mineral-deleted BSM were examined.

a), c) Refer to the footnotes of Table 2.

d) NaCl, CaCl₂, MnCl₂, (NH₄)₂SO₄ and CoCl₂.

れたが、孢子形成は不良であった(表3)。特に VPI 10463株, KZ 1626 株においては孢子形成は不良であり、各々 $0, 10^{0.5}/\text{ml}$ の孢子形成が認められたにすぎなかった。

FeSO_4 欠損 BSM における OD_{max} は $0.29 \sim 0.32$ であり BSM の約40~50%であった。しかしながら、孢子形成は不良であり BSM の 10^{-11} 倍 (KZ 1626株)~ 10^{-22} 倍 (KZ 1630株) にすぎなかった。

他の5種類のミネラルについては孢子形成および菌の発育は共に BSM と同程度であった。なお、いずれの培養においても培養5日目の pH はほぼ等しく $7.1 \sim 7.3$ であった。

2) 必須ミネラルの濃度

VPI 10463株を用い、孢子形成に必須の MgCl_2 , FeSO_4 の必要濃度について検討した。

前培養には MgCl_2 あるいは FeSO_4 濃度が 1mM の BSM を用いた。 MgCl_2 , FeSO_4 のいずれの場合にも、十分な孢子形成に要する量と十分な発育に必要な量とは等しかった。即ち、 MgCl_2 の場合、孢子形成・菌の発育は共に 0.01mM 以上の時上昇し、 0.1mM の時最高値に達した。 FeSO_4 の場合、孢子形成・菌の発育は共に 0.0005mM 以上の時上昇し、 0.001mM の時最高値に達した(図2)。

2. 緩衝系ミネラル

1) 孢子形成に必須のミネラル

KH_2PO_4 および Na_2HPO_4 を共に欠損した BSM では菌の発育

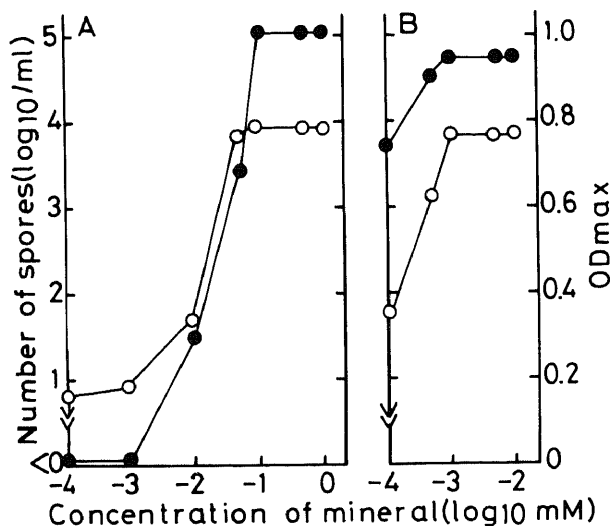


Fig. 2. Relationship between concentration of MgCl_2 (A), or FeSO_4 (B), and sporulation in *C. difficile* VPI 10463 strain. ○, OD_{max} ; ●, number of spores produced.

はほとんどみられなかった (OD_{max} , $0.01 \sim 0.06$)。また、孢子形成も認められなかった(表4)。5日間培養菌液の pH は 7.4 であった。

KH_2PO_4 欠損 BSM における OD_{max} は $0.15 \sim 0.17$ であり、BSM (OD_{max} , $0.73 \sim 0.84$) の約 $1/5$ であった。しかしながら、孢子形成は不良であり BSM の 10^{-15} (KZ 1748株)~ 10^{-44} (VPI 10463株) にすぎなかった。5日間培養菌液の pH は $7.1 \sim 7.4$ であった。

Na_2HPO_4 欠損 BSM における OD_{max} は $0.75 \sim 0.85$ であり、BSM と比べ明らかな差異は認められなかった。孢子形成は KZ 1630株, KZ 1748株では BSM とほぼ等しかったが、残り3株では BSM の約 $1/100$ にすぎなかった。5日間培養菌液の pH は $6.9 \sim 7.0$ であった。

NaHCO_3 欠損 BSM における OD_{max} は $0.72 \sim 0.85$ であり BSM と比べ明らかな差異は認められなかった。孢子形成は KZ

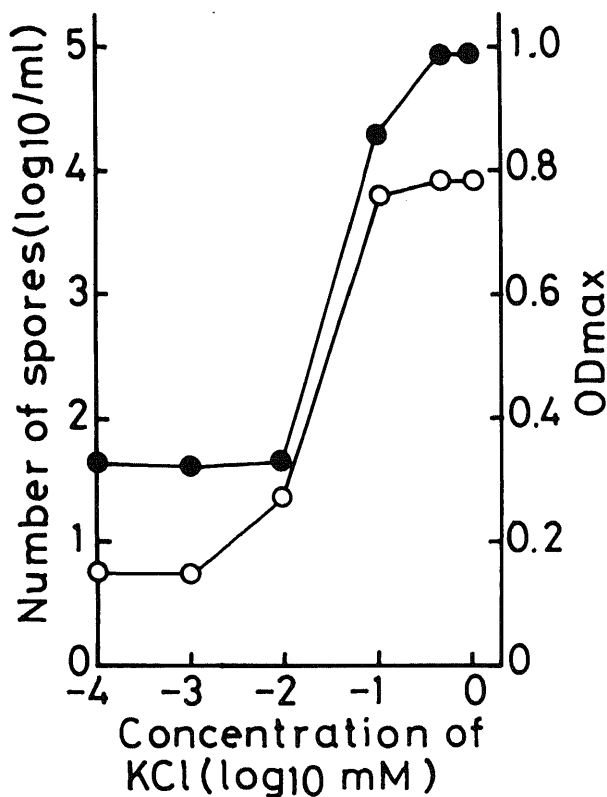


Fig. 3. Relationship between concentration of KCl and sporulation in *C. difficile* VPI 10463 strain. ○, OD_{max} ; ●, number of spores produced.

Table 4. Effect of deletion of mineral associated with buffer system on sporulation

Deleted mineral	Growth ^{a)} and number of spores (\log_{10}/ml) in strains									
	VPI 10463		KZ 1626		KZ 1647		KZ 1630		KZ 1748	
	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore
KH_2PO_4 , Na_2HPO_4	+	— ^{b)}	+	—	+	—	+	—	+	2.2
KH_2PO_4	+	1.4	+	1.6	+	2.8	+	1.6	+	3.7
Na_2HPO_4	≡	3.7	≡	2.6	≡	3.7	≡	4.8	≡	4.8
NaHCO_3	≡	1.6	≡	2.2	≡	3.7	≡	4.3	≡	4.5
None	≡	5.8	≡	5.0	≡	5.6	≡	4.7	≡	5.2

a), b) Refer to the footnotes of Table 2.

1630株, KZ 1748株ではBSMとほぼ等しかったが, 残り3株についてはBSMに比べ明らかに不良であった。特にVPI 10463株における孢子形成は不良であり, BSMの 10^{-4} にすぎなかった。NaHCO₃欠損BSMにおいては他のミネラル欠損培地の場合と異なり, 5日間培養菌液のpHは極端に低く, 5.8~6.2であった。

2) K⁺, PO₄³⁻の濃度と孢子形成

以上のKH₂PO₄・Na₂HPO₄欠損BSM, KH₂PO₄欠損BSMにおける成績は孢子形成・菌の発育にはK⁺, PO₄³⁻が必須である可能性を示している。先ずKClを用いK⁺濃度について検討した。次いで決定された濃度のKClを含む条件下でPO₄³⁻を種々の濃度に添加することによりPO₄³⁻濃度について検討した。本実験にはVPI 10463株を用いた。K⁺濃度の検討にはリン酸緩衝系としてNaH₂PO₄・Na₂HPO₄系を用いKClを種々の濃度に添加する系を用いた。

菌の発育はKCl濃度が0.01mM以上の時, 濃度依存性に増加し, 0.5mMの時最高値に達した。孢子数の増加はKCl濃度が0.1mMから上昇し, 菌の発育の場合と同様0.5mMの時, 最高値に達した(図3)。

次に, 上述の結果に基づきKCl 1mM添加・KH₂PO₄およびNa₂HPO₄非添加BSMにPO₄³⁻を種々の濃度に添加することによりPO₄³⁻濃度について検討した。PO₄³⁻としてNaH₂PO₄およびNa₂HPO₄を1:4の割合に添加した。

孢子数・菌の発育はPO₄³⁻濃度が0.1mM以上の時, 濃度依

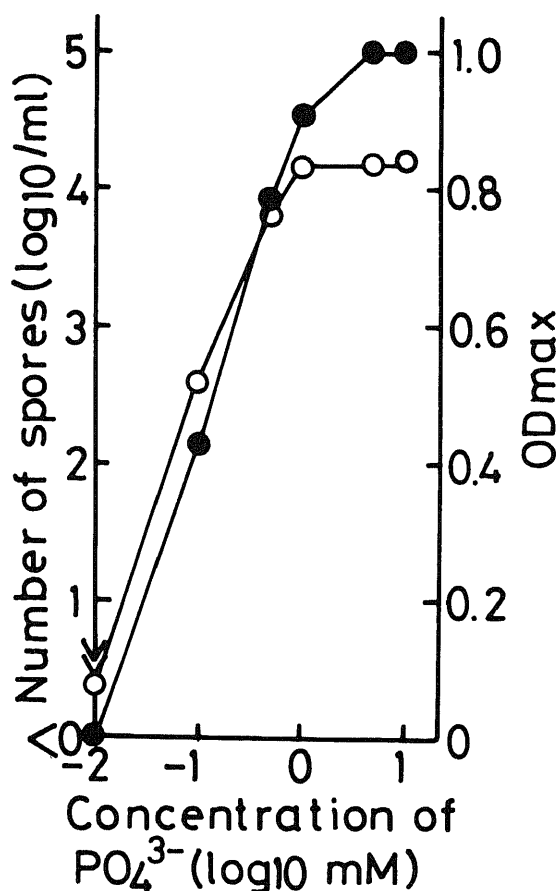


Fig. 4. Relationship between concentration of PO₄³⁻ and sporulation in *C. difficile* VPI 10463 strain. ○, OD_{max}; ●, number of spores produced.

存性に上昇し, 孢子数は5mMの時, 菌の発育は1mMの時最高値に達した(図4)。

3) NaHCO₃濃度と孢子形成

VPI 10463株を用い, NaHCO₃濃度と孢子形成の関係を特に

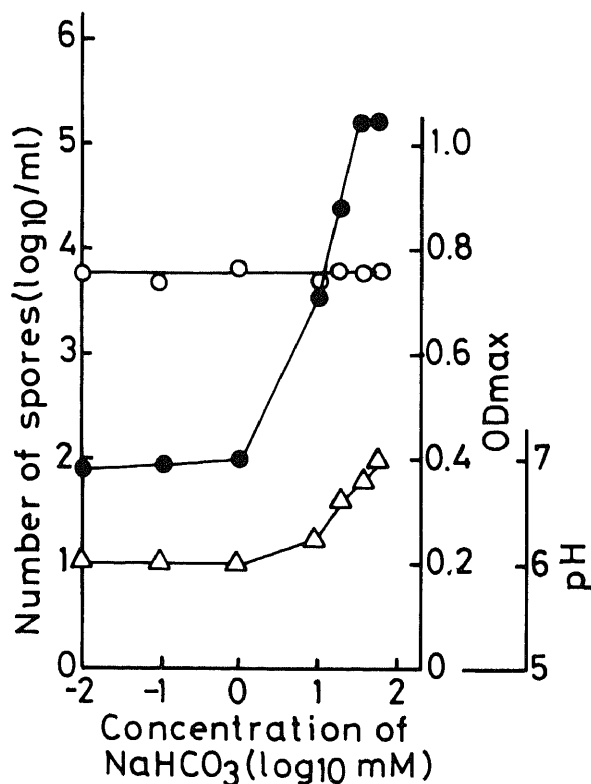


Fig. 5. Relationship between concentration of NaHCO₃ and sporulation in *C. difficile* VPI 10463 strain. ○, OD_{max}; ●, number of spores produced; △, pH of culture.

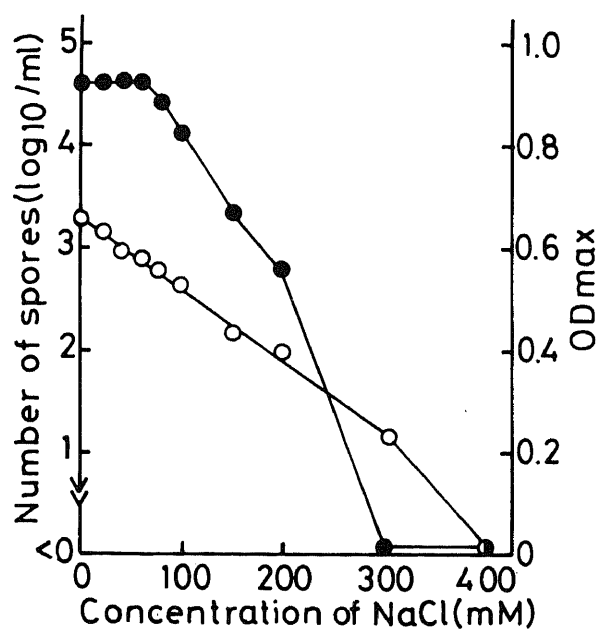


Fig. 6. Relationship between concentration of NaCl and sporulation in *C. difficile* VPI 10463 strain. ○, OD_{max}; ●, number of spores produced.

培養菌液の pH の観点から検討した。

菌の発育は NaHCO_3 濃度とかかわりなく OD_{\max} 0.73~0.78 であった (図 5)。孢子形成は NaHCO_3 濃度が 10mM で上昇し、40mM の時最高値に達した。5 日間培養菌液の pH は NaHCO_3 が 0~1mM までは 6.0 であったが、10mM 以上では濃度依存性に上昇し 40mM では 6.8, 60mM では 7.0 を示した。

Ⅲ. NaCl の菌の発育・孢子形成抑制作用

まず VPI 10463 株を用いて NaCl 濃度と菌の発育・孢子形成の関係について検討した。

菌の OD_{\max} は NaCl 濃度の増加と共に減少し、かつ OD_{\max} に達するにはより長い培養時間を要した。菌の発育は NaCl 濃度が 100mM までは培養 34 時間以内に OD_{\max} に達したが、150, 200, 300mM においては OD_{\max} は各々培養 2, 3, 4 日目に得られた。また、400mM の時は菌の発育は認められなかった (図 6)。

孢子形成は NaCl 濃度が 60mM までは $10^{4.7}/\text{ml}$ であったが 80~200mM においては対数的に減少し、300mM 濃度においては孢子は全く認められなかった。

以上の成績に基づき、他の 4 株について発育・孢子形成抑制 NaCl 濃度を求めた (表 5)。

4 株全株共に VPI 10463 株と同様、NaCl 濃度 400mM の時菌の発育・孢子形成共に全く認められなかった。

考 察

C. difficile は抗生物質関連偽膜性大腸炎、下痢症の原因菌であり本菌の産生する 2 種類の毒素、トキシン A、トキシン B が主病原因子と考えられている⁹⁾。これら *C. difficile* 腸炎の発症機序については以下の如くに考えられている¹⁰⁾。抗生物質投与により腸内細菌叢が乱された結果、有毒 *C. difficile* が増殖し毒素を産生する。まず、トキシン A が腸管上皮細胞に働き、血管からの顆粒球の遊走を促し、さらに化学伝達物質の放出を促進し、腸管上皮の損傷、出血を伴う液体の分泌を亢進させ、下痢を惹起させる。トキシン B はトキシン A により損傷を受けた部位から粘膜内に侵入し、毒作用を発揮する。

C. difficile 腸炎の感染様式には内因感染および外因感染が考えられている。内因感染は健康なヒトの腸管内に本菌が正常細菌叢として存在することに基づいている。*C. difficile* 分離率は国により異なるが、Nakamura ら¹¹⁾ は我が国の若年者、老年者合計 431 名の糞便について *C. difficile* の分離を試み 49 名 (11.4%) から本菌を分離した。外因感染は病院における集団発生の主感染経路として考えられており、種々の疫学的研究により支持されている。Burdon¹²⁾ は、ある特定の外科病棟での *C.*

difficile 腸炎 95 名中 62 名から同一の抗生物質感受性パターンを示す *C. difficile* が分離されたが、他の病棟から分離した 35 株については 2 株のみが先と同一の抗生物質感受性パターンを示したと報告した。Wüst ら¹³⁾ は集団発生の場合、プラスミド DNA の電気泳動パターン、可溶性タンパクの電気泳動パターン、抗生物質感受性パターン上同一の菌株が分離されることを明らかにした。

外因感染は病院環境に存在する *C. difficile* に因る。Mulligan ら³⁾、Kim ら⁴⁾ は *C. difficile* 腸炎患者が入院している病棟について、洗面所、床、ベッド、浴場等について *C. difficile* の検索を試み数%~数 10% の割合に本菌を検出したと述べている。この場合、*C. difficile* は嫌気性孢子形成菌であるので、大気下では栄養型細胞は速やかに死滅するが、孢子の形で長期間生存し、感染源となる⁴⁾。

C. difficile 腸炎の治療にはバンコマイシン、メトロニダゾールが用いられるが、これら薬剤の投与中止後しばしば再発する¹⁷⁾。再発の頻度は 25% にも及ぶことがある⁹⁾。*C. difficile* はバンコマイシン、メトロニダゾールに感受性であるので、これら薬剤により栄養型細胞は死滅するが孢子が残り、薬剤の投与中止により孢子が発芽・増殖することにより再発すると考えられている。

最近、Kamiya ら¹⁸⁾ は本菌の毒素産生と孢子形成との関連性を検討し、本菌の毒素は孢子形成時期に合成され、培地中に放出されることを明らかにした。

以上に述べた如く、*C. difficile* 腸炎において本菌の孢子は大きな役割を演じており、孢子の形成条件を明らかにすることは本腸炎の発症機序の解明に重要な意義を有する。沖野⁸⁾ は孢子形成とアミノ酸について検討し、孢子形成にはトリプトファン、バリン、システイン、プロリン、ロイシン、メチオニンが必須であることを明らかにした。本研究で、著者はビタミン、ミネラルについて検討した。本研究では先ず各種ビタミン欠損 BSM を用い、*C. difficile* の孢子形成に必須のビタミンを求めた。被験菌株の十分な孢子形成に必須のビタミンは同時に発育に必須のビタミンであり、Ca-D-パントテン酸、ビオチン、ピリドキシンが孢子形成・発育に必須であった。Ca-D-パントテン酸欠損 BSM では菌の発育は肉眼的には認められなかった。しかしながら、ビオチンあるいはピリドキシン欠損 BSM においては、菌の発育は BSM の 1/3~1/5 程度に認められたにもかかわらず、KZ 1647 株を除き、孢子形成は BSM の 10^{-3} 倍以下にすぎなかった。このことはビオチンおよびピリドキシンは孢子形成に特に必須であることを示唆している。*C. difficile* の合成培地として種々報告されているが、Haslam ら⁹⁾ の培地に

Table 5. Influence of concentration of NaCl on sporulation of *C. difficile* strains

Concentration of NaCl (mM)	Growth ^{a)} and number of spores (\log_{10}/ml) in strains							
	KZ 1626		KZ 1647		KZ 1630		KZ 1748	
	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore	Growth	Spore
0	+++	5.3	+++	5.4	+++	5.4	+++	5.5
100	+++	5.5	+++	4.1	+++	4.0	+++	5.5
200	+++	3.7	++	3.3	++	2.3	++	4.0
300	++	2.5	++	3.1	++	2.5	++	3.2
400	—	— ^{b)}	—	—	—	—	—	—

a), b) Refer to the footnotes of Table 2.

はビタミンとして上記3種類に加うるにチアミン、ニコチンアミド、リボフラビン、p-アミノ安息香酸、葉酸、 B_{12} が含まれている。またHubert ら¹⁹⁾の培地ではCa-D-パントテン酸、ビオチン、ピリドキシンのみが、Seddon ら²⁰⁾の培地にはニコチン酸、リボフラビンのみが含まれている。これらのいずれの培地についても実験的に必須ビタミンを検索したのではなく、他の菌種に用いた組成をそのまま用いているにすぎず、本研究により初めて *C. difficile* の孢子形成・発育に必須なビタミンは上記3種類であることが分かった。また、Ca-D-パントテン酸、ビオチン、ピリドキシン各々 1,000 μ g/l, 0.5 μ g/l, 10 μ g/l の時、孢子形成・発育は最高値に達した。

これらのビタミンは *C. difficile* の孢子形成・発育に必須であったが、孢子形成に要する量は発育に要する量に比べ幾分大量を要した。これは孢子形成は菌の発育後に起こる現象であり、より高次の多数の生合成過程を要するためと思われる。

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) の場合十分な発育に必須のビタミン(至適濃度)はCa-D-パントテン酸(300 μ g/l)、ビオチン(0.3 μ g/l)、ピリドキサミン(100 μ g/l)、リボフラビン(100 μ g/l)、あるいはCa-D-パントテン酸(200 μ g/l)、ビオチン(0.04 μ g/l)、ピリドキシン(800 μ g/l)^{21)~23)}である。また、*Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) の発育に必須のビタミンはビオチン、ピリドキサミン、p-アミノ安息香酸、ニコチン酸、チアミン²⁴⁾である。*C. perfringens*, *C. difficile* は共にヒトの腸内の正常細菌叢を形成する菌種であり、両菌種共に同じ、少数のビタミン類が必須であることが示唆された。しかしながら、その必要量は幾分異なり、*C. difficile* は *C. perfringens* に比べより大量のCa-D-パントテン酸およびより少量のピリドキシンを要することが示された。

次に各種ミネラル欠損BSMを用い、*C. difficile* の孢子形成に必須のミネラルを求めた。先ず非緩衝系ミネラルのNaCl, $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, $FeSO_4$, $CoCl_2$ について検討した。ビタミンの場合と同様、被験菌株の十分な孢子形成に必須のミネラルは同時に発育に必須のミネラルであり、 $MgCl_2$ および $FeSO_4$ が孢子形成・発育に必須であった。 Cl^- , SO_4^{2-} は他のミネラルにも含まれているので Mg^{2+} , Fe^{2+} が必須であると考えられた。 $FeSO_4$ 欠損培地においても孢子形成・菌の発育はかなり良好であったが、これは Fe^{2+} の必要量は少なく、かつ Fe^{2+} は混雑物として少量ではあるが各種アミノ酸、ミネラル、特にリン酸化化合物(使用した Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 中の Fe^{2+} 含有量: Na_2HPO_4 , 0.002%; KH_2PO_4 , 0.001%)に含まれていることに起因すると思われる。非緩衝系ミネラルとしてはHaslam ら⁹⁾の合成培地にはNaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, $FeSO_4$, $CoCl_2$ が含まれている。また、Hubert ら¹⁹⁾の培地には $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, Seddon ら²⁰⁾の培地には $MgSO_4$, NaCl, $FeSO_4$ が含まれている。先に述べた如く、これらの培地に関しては他の菌種に用いられた組成をそのまま用いているにすぎない。以上を考えると、本研究で明らかにした如く、 Mg^{2+} , Fe^{2+} が孢子形成・発育に必須のミネラルと考えられる。 $MgCl_2$, $FeSO_4$ の孢子形成・発育に必要な量はほぼ等しく、各々 0.1mM, 0.001mM であった。

緩衝系ミネラルの Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 を共に欠損したBSMにおいては、孢子形成・菌の発育共にほとんど認められず、 KH_2PO_4 欠損BSMにおいても孢子形成・発育は極めて不良であった。一方、 Na_2HPO_4 欠損BSMにおいては孢子形成・菌の

発育はかなり良好であった。上述の所見、およびBSMにおける Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 濃度は各々 35mM, 6.6mMであることを考えあわせると K^+ および PO_4^{3-} が必須であると考えられた。まず緩衝系として Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 の代わりに Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 を用い、各種濃度にKClを添加した結果、KCl濃度の増加と共に孢子形成・菌の発育は増加し、0.5mM濃度の時、最高値に達した。これらの結果は K^+ が必須であることを示している。次にBSMにあらかじめKClを1mM濃度に添加し、 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (濃度比, 1:4)を増量した結果、これらの濃度依存性に孢子形成・菌の発育は増加し5mMの時、最高値に達した。即ち PO_4^{3-} が*C. difficile*の孢子形成・発育に必須であることが示された。

$NaHCO_3$ 欠損BSMにおいては菌の発育は良好であったが、孢子形成は不良であった。 $NaHCO_3$ 欠損BSMにおいては、植菌時のpHは7.7であったが、培養5日後には6.0まで低下した。通常培地pHが低下すると孢子形成は不良となるので、 $NaHCO_3$ 欠損BSMにおける孢子形成の低下は培養中のpHの低下と考えられた。事実、 $NaHCO_3$ 濃度を増加した時、培養液のpHは上昇し、 $NaHCO_3$ 濃度40mM以上の時、培養液のpHは6.8以上を示し、同時に孢子数も最高値に達した。

以上を総括すると*C. difficile*の孢子形成・発育に必須のミネラルは本実験条件下では $MgCl_2$, $FeSO_4$, Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 緩衝系であり、 Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} が重要であると思われた。これらの中で Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^+ 欠損BSMにおいては、菌の発育は各々BSMの1/3~1/4, 1/2, 1/5程度に認められたにもかかわらず、孢子形成は概ね各々BSMの 10^{-4} 倍以下、 10^{-1} 倍以下、 10^{-3} 倍以下にすぎなかった。このことはこれらの塩類は孢子形成に、特に必須であることを示唆している。孢子形成に特異的に作用する元素については*Bacillus*属菌種について種々検討されており、 K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} が重要であると報告されている^{25)~28)}。

*C. perfringens*の発育に必須のミネラルは Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} であり^{21)~23)}、その至適濃度に関し、Fuchs ら²²⁾は Mg^{2+} 0.5mM, Fe^{2+} 0.005mM, K^+ 0.1~50mM, PO_4^{3-} 0.05~125mMと報告し、Murata ら²³⁾は Mg^{2+} 0.02~0.08mM, Fe^{2+} 0.02~0.2mM, K^+ 10mM, PO_4^{3-} 10~30mMと報告している。即ち*C. perfringens*と*C. difficile*は質的にも量的にも極めて類似したミネラル要求性を有することが示された。

NaClは一般に細菌に対し発育抑制作用³¹⁾を示し、食品からの感染の観点から、耐塩性がしばしば問題とされる。*Clostridium*属の中では*C. botulinum*についてその耐塩性が詳細に検討されており、発育抑制NaCl濃度は2~6%である³²⁾。本研究で示した様に、*C. difficile*における発育抑制NaCl濃度は400mM(2.3%)であり、*C. botulinum* C型菌とはほぼ同じであった。また、NaCl濃度が100mM以上の時、菌の発育の減少に比べ、より顕著に孢子形成が減少した。このことは食品のNaCl処理は*C. difficile*による食品の汚染予防には極めて有効であることを示唆している。

結 論

*C. difficile*の孢子形成に必須のビタミン、ミネラルを5菌株を用いて合成培地にて検討し、更にNaClの発育抑制作用について検討し、次の結果を得た。

1. *C. difficile*の孢子形成に必須のビタミンは5株全株に

において、Ca-D-パントテン酸、ビオチン、ピリドキシンであった。また、これらは菌の発育にも必須のビタミンであることが分った。

2. これらのビタミンのいずれに関しても、菌 (VPI 10463 株) の十分な孢子形成に要する量と十分な発育に必要な量は等しく、Ca-D-パントテン酸、ビオチン、ピリドキシン、各々 1,000 μ g/l, 0.5 μ g/l, 10 μ g/l の時、孢子形成・発育は最高値に達した。

3. 孢子形成に必須のミネラルは5株全株において Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} であった。また、これらは菌の発育にも必須のミネラルであった。

4. これらのミネラルいずれに関しても、菌 (VPI 10463 株) の十分な孢子形成に要する量と十分な発育に必要な量はほぼ等しく、 Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} 各々 0.1mM, 0.001mM, 0.5mM, 5mM の時、孢子形成・発育は最高値に達した。

5. $NaHCO_3$ は培地 pH の低下を防ぐために必要であり、40mM 以上の時、培養菌液の pH は6.8以上を示し、孢子形成は最高値に達した。

6. 被験5菌株共に NaCl 濃度が 400mM の時、孢子形成・菌の発育は共に認められなかった。

以上の結果は、腸内細菌叢として存在する *C. difficile* は、その孢子形成・発育に、同じ腸内細菌叢として存在する *C. perfringens* とほぼ同じ種類のビタミン、ミネラルを必要とすることを示している。また、本菌の食塩耐性は比較的弱いことを示している。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導御校閲を賜りました恩師中村信一教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり多大な御協力を戴いた微生物学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bartlett, J. G.: Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Rev. Infect. Dis., 1, 530-539 (1979).
- 2) Lyerly, D. W., Krivan, H. C. & Wilkins, T. D.: *Clostridium difficile*: its disease and toxin. Clin. Microbiol. Rev., 1, 1-18 (1988).
- 3) Mulligan, M. E., Rolfe, R. D., Finegold, S. M. & George, W. L.: Contamination of a hospital environment by *Clostridium difficile*. Curr. Microbiol., 3, 173-175 (1979).
- 4) Kim, K. H., Fekety, R., Batts, D. H., Brown, D., Cudmore, M., Silva, Jr. J. & Waters, D.: Isolation of *Clostridium difficile* from the the environment contacts of patients with antibiotic-associated colitis. J. Infect. Dis., 143, 42-50 (1981).
- 5) Testore, G. P., Pantosti, A., Cerquetti, M., Babudieri, S., Panichi, G. & Gianfrilli, P. M.: Evidence for cross-infection in an outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a surgical unit. J. Med. Microbiol., 26, 125-128 (1988).
- 6) Bartlett, J. G.: Treatment of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Rev. Infect. Dis., 6, (Suppl. 1), s235-s241 (1984).
- 7) Finegold, S. M. & George, W. L.: Therapy directed against *Clostridium difficile* and its toxins: complications of therapy. In R. D. Rolfe & S. M. Finegold (eds.), *Clostridium difficile*: Its Role in Intestinal Disease, p341-357, Academic Press, San Diego, 1988.
- 8) 沖野善則: *Clostridium difficile* の孢子形成に及ぼすアミノ酸の影響. 十全医会誌, 101, 68-78 (1992).
- 9) Haslam, S. C., Ketley, J. M., Mitchell, J., Stephen, J., Burdon, D. W. & Candy, D. C. A.: Growth of *Clostridium difficile* and production of toxins A and B in complex and defined media. J. Med. Microbiol., 21, 293-297 (1986).
- 10) 蓮池 徹, 神谷 茂, 沖野善則, 川辺清光, 孟 筱琦, 中村信一.: *Clostridium difficile* の毒素産生用合成培地の緩衝系, グルコース濃度の検討. 医学と生物学, 123, 249-254 (1991).
- 11) Nakamura, S., Mikawa, M., Nakashio, S., Takabatake, M., Okada, I., Yamakawa, K., Serikawa, T., Okumura, S. & Nishida, S.: Isolation of *Clostridium difficile* from the feces and antibody in sera of young and elderly adults. Microbiol. Immunol., 25, 345-351 (1981).
- 12) Nakamura, S., Yamakawa, K., Izumi, J., Nakashio, S. & Nishida, S.: Germinability and heat resistance of spores of *Clostridium difficile* strains. Microbiol. Immunol., 29, 113-118 (1985).
- 13) Kamiya, S., Yamakawa, K., Ogura, H. & Nakamura, S.: Effect of various sodium taurocholate preparations on the recovery of *Clostridium difficile* spores. Microbiol. Immunol., 31, 1117-1120 (1987).
- 14) 中村信一: クロストリディウム・ディフィシルの病原因子. 医学細菌学第5巻 (三輪俊夫 監修), 56-97 頁, 葉根出版, 東京, 1990.
- 15) Burdon, D. W.: *Clostridium difficile*: the epidemiology and prevention of hospital-acquired infection. Infection, 10, 203-204 (1982).
- 16) Wüst, J., Sullivan, N. M., Hardegger, U. & Wilkins, T. D.: Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. J. Clin. Microbiol., 16, 1096-1101 (1982).
- 17) Bartlett, J. G.: Antibiotic-associated diarrhea. Clin. Infect. Dis., 15, 573-579 (1992).
- 18) Kamiya, S., Ogura, H., Meng, X. O. & Nakamura, S.: Correlation between cytotoxin production and sporulation in *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol., 37, 206-210 (1992).
- 19) Hubert, J., Ionesco, H. & Sebalt, M.: Detection de *Clostridium difficile* par isolement sur milieu minimal selectif par immunofluorescence. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 132 A, 149-157 (1981).
- 20) Seddon, S. V. & Borriello, S. P.: A chemically defined and minimal medium for *Clostridium difficile*. Lett. Appl. Microbiol., 9, 237-239 (1989).
- 21) Boyd, M. J., Logan, M. A. & Tytell, A. A.: The growth requirements of *Clostridium perfringens* (welchii)

BP6K. J. Biol. Chem., 174, 1013-1025 (1948).

22) Fuchs, A. R. & Bonde, G. J.: The nutritional requirements of *Clostridium perfringens*. J. Gen. Microbiol., 16, 317-329 (1957).

23) Seibalt, M. & Costilow, R. N.: Minimal growth requirements for *Clostridium perfringens* and isolation of auxotrophic mutants. Appl. Microbiol., 29, 1-16 (1975).

24) Whitmer, M. E. & Johnson, E. A.: Development of improved defined media for *Clostridium botulinum* serotypes A, B, and E. Appl. Environ. Microbiol., 54, 753-759 (1988).

25) Grelet, N.: Le déterminisme de la sporulation de *Bacillus megatherium*. Ann. Inst. Pasteur, 81, 430-440 (1951).

26) Grelet, N.: Le déterminisme de la sporulation de *Bacillus megatherium*. Ann. Inst. Pasteur, 82, 66-77 (1952).

27) Charney, J., Fisher, W. P. & Hegarty, C. P.: Manganese as essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. J. Bacteriol., 62, 145-148 (1951).

28) Curran, H. R. & Evans, F. R.: The influence of iron or manganese upon the formation of spores by mesophilic aerobes in fluid organic media. J. Bacteriol., 67, 489-497 (1954).

29) Murata, R., Yamamoto, A., Soda, S. & Ito, A.: Nutritional requirements of *Clostridium perfringens* PB6K for alpha toxin production. Jpn. J. Med. Sci. Biol., 18, 189-202 (1965).

30) Murata, R., Soda, S., Yamamoto, A. & Ito, A.: Further investigations on the influence of inorganic cations on growth and toxin production by *Clostridium perfringens* PB6K. Jpn. J. Med. Sci. Biol., 21, 55-70 (1968).

31) Stanier, R. Y., Adelberg, E. A. & Ingraham, J. L.: General Microbiology, 4th ed., p293-313, J. W. Arrowsmith Ltd., Bristol, 1977.

32) Roberts, T. A. & Gibson, A. M.: The relevance of *Clostridium botulinum* type C in public health and food processing. J. Food Technol., 14, 211-226 (1979).

Vitamins and Minerals Essential for Sporulation of *Clostridium difficile* Kiyomitsu Kawabe, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., 103, 27—35 (1994)

Key words *C. difficile*, sporulation, vitamin, mineral, synthetic medium

Abstract

Vitamins and minerals essential for the sporulation of *Clostridium difficile* (*C. difficile*), which is the cause of pseudomembranous colitis and some cases of antibiotic-associated diarrhea, were examined using 5 strains in a synthetic medium. By using a desired vitamin-deficient medium, it was revealed that, for sufficient sporulation and growth to occur, Ca-D-pantothenate, biotin and pyridoxine were essential in all strains tested. It was also suggested that among these 3 Vitamins, biotin and pyridoxine are particularly required for the sporulation in *C. difficile*. When the relationship between sporulation and the concentration of Ca-D-pantothenate, biotin or pyridoxine was examined, both sporulation and growth reached the maximum at the concentration of 1,000 μ g/l of Ca-D-pantothenate, 0.5 μ g/l of biotin or 10 μ g/l of pyridoxine. By using a desired mineral-deficient medium, it was revealed that, for sufficient sporulation and growth to occur, Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^+ and PO_4^{3-} were essential in all strains tested. Results obtained also indicated that among these minerals, Mg^{2+} , Fe^{2+} and K^+ might be particularly required for the sporulation in *C. difficile*. When the relationship between sporulation and the concentration of Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^+ or PO_4^{3-} was examined, both sporulation and growth reached the maximum at the concentration of 0.1 mM of Mg^{2+} , 0.001 mM of Fe^{2+} , 0.5 mM of K^+ or 5 mM of PO_4^{3-} . In $NaHCO_3$ -deficient medium, although bacterial growth was luxuriant, the sporulation was poor with the significant decreases of pH (pH values, 5.9-6.2) of the bacterial cultures, indicating that $NaHCO_3$ was essential to prevent the decrease of pH during incubation. When the concentration of $NaHCO_3$ was 40 mM or more, pH of bacterial cultures was above 6.8 and sufficient sporulation was obtained. Neither sporulation nor growth occurred in all strains tested at the concentration of 400 mM of NaCl. These findings indicate that, for sporulation and growth, *C. difficile*, which is a member of the intestinal bacterial flora, requires the same kind of vitamins and minerals as *Clostridium perfringens*, which is also a member of the intestinal bacterial flora, and that NaCl resistance of *C. difficile* was relatively weak among clostridial species.